



การคัดแยกไลติกเฟจและการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ
Pseudomonas aeruginosa TISTR1287
Isolation and Anti-biofilm Activity of Lytic Phages against
Pseudomonas aeruginosa TISTR1287

นันทนิจ จารุเศรณี^{1,2}, ศรีนพน นิยม² และ สมบูรณ์ คำเตจา^{3*}

Nanthanit Jaruseranee^{1,2}, Srinuan Niyom² and Somboon Kamtaeja^{3*}

¹ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ประเทศไทย

² กลุ่มวิจัยผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์และนวัตกรรม มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ประเทศไทย

³ คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย ประเทศไทย

¹School of Science, Mae Fah Luang University, Thailand

² Microbial Products and Innovation Research Unit, Mae Fah Luang University, Thailand

³Faculty of Education, Chiang Rai Rajabhat University, Thailand

Received : 4 October 2022

Revised : 22 March 2023

Accepted : 6 June 2023

บทคัดย่อ

ไลติกเฟจสามารถเป็นทางเลือกในการยับยั้งไบโอฟิล์มของ *Pseudomonas aeruginosa* ไบโอฟิล์มเป็นสารพอลิเมอร์นอกเซลล์ของแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญต่อการก่อการติดเชื้อของแบคทีเรีย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกไลติกเฟจจากตัวอย่างน้ำและดินที่เก็บจากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง และเพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* TISTR1287 จากการคัดแยกไลติกเฟจด้วยวิธีเพิ่มปริมาณ และแยกไลติกเฟจบริสุทธิ์ สามารถแยกไลติกเฟจจำนวน 4 ไอโซเลต คือ PAMFUP1, PAMFUP2, PAMFUP3 และ PAMFUP4 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงต่อโฮสต์ต่อ *P. aeruginosa* จำนวนสี่สายพันธุ์ พบว่า เฟจทั้งสี่ไอโซเลตมีความจำเพาะเจาะจงต่อ *P. aeruginosa* TISTR1287 โดยเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่ได้จากเฟจไอโซเลต PAMFUP1, PAMFUP2, PAMFUP3 และ PAMFUP4 คือ 0.80 ± 0.15 มม., 0.77 ± 0.18 มม., 0.98 ± 0.13 มม. และ 3.90 ± 0.44 มม. ตามลำดับ และจากการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งไบโอฟิล์มของเฟจ พบว่า เมื่อบ่มเฟจร่วมกับ *P. aeruginosa* TISTR1287 เป็นเวลา 8 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมง ปริมาณไบโอฟิล์มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.00$)

คำสำคัญ : ชูโดโมแนส ; แอรูจินอซา ; ไบโอฟิล์ม ; ปฏิชีวนะ ; ไลติกเฟจ



Abstract

Lytic phages act as an alternative inhibitor against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. A biofilm, a matrix composed of bacterial extracellular polymeric substances, is vital in exacerbating the spread of antibiotic resistance. This research aimed to isolate lytic phages from water and soil samples collected from Mae Fah Luang University premises and investigate their anti-biofilm activity against *P. aeruginosa* TISTR1287. Phages were isolated using an enrichment protocol and a double overlay agar plaque assay. Four lytic phage isolates were identified and named PAMFUP1, PAMFUP2, PAMFUP3, and PAMFUP4. Spot tests revealed that all four phages are specific for *P. aeruginosa* TISTR1287. The plaque diameters reached by phage isolates PAMFUP1, PAMFUP2, PAMFUP3, and PAMFUP4 were 0.80 ± 0.15 mm, 0.77 ± 0.18 mm, 0.98 ± 0.13 mm, and 3.90 ± 0.44 mm, respectively. Finally, crystal violet assays were performed to determine biofilm inhibition by four phages. The results demonstrated that these four phages significantly reduced the biofilm formation at 8 hrs and 24 hrs post incubation ($p < 0.00$).

Keywords : antibiotic ; biofilm ; lytic phage ; *Pseudomonas aeruginosa*



บทนำ

แบคทีริโอเฟจ (bacteriophage) หรือ เฟจ (phage) เป็นไวรัสที่เข้าทำลายแบคทีเรีย เฟจสามารถดำรงชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย (Phumkhachorn & Rattanachaikunsopon, 2019) เฟจทำหน้าที่ควบคุมจำนวนแบคทีเรีย เนื่องจากมีคุณสมบัติเข้าทำลายแบคทีเรีย เฟจบางชนิดอาจเข้าทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งเท่านั้น เมื่อแบคทีเรียถูกบุกรุก (infect) เฟจจะเพิ่มจำนวนโดยอาศัยกลไกภายในเซลล์ของแบคทีเรียเพื่อสร้างโปรตีนและจำลองสารพันธุกรรมของเฟจ (Phumkhachorn & Rattanachaikunsopon, 2019) และเฟจที่มีวงจรชีวิตแบบไลติก หรือไลติกเฟจสามารถทำลายเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านได้ เมื่อเฟจจำนวนมากต้องการออกจากเซลล์สามารถทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกจึงทำลายเซลล์แบคทีเรียได้ (Casto *et al.*, 2016) ในปัจจุบันการนำไลติกเฟจมาใช้ กำจัดแบคทีเรียจึงได้รับความสนใจ ทั้งในด้านการควบคุมจำนวนแบคทีเรียในด้านการเกษตรและปศุสัตว์ (Casto *et al.*, 2016) การตรวจคุณภาพและการถนอมอาหาร (Shors, 2013) การแพทย์และอุตสาหกรรม (Phumkhachorn & Rattanachaikunsopon, 2019) เป็นต้น

Pseudomonas aeruginosa เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแบบแท่ง สามารถเจริญได้ดีที่ อุณหภูมิ 25-37 องศาเซลเซียส เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ (Cisek *et al.*, 2017) *P. aeruginosa* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียก่อโรคที่ดื้อต่อยาหลายขนาน (multidrug-resistant bacteria, MDR) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการแล้วว่าดื้อต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อยสามกลุ่ม (Chegini *et al.* 2020; Sharma *et al.*, 2021; Rattanachak *et al.*, 2022) เป็นสาเหตุสำคัญของ การติดเชื้อเรื้อรังในคนและผู้ป่วยต้องได้รับการรักษาเป็นเวลานาน (Adnan *et al.*, 2020) ปัจจุบันมีรายงานการพบแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ในผู้ป่วยหลายโรค เช่น โรคติดเชื้อแบคทีเรีย โรคปอดบวม โรคกระเพาะปัสสาวะอักเสบ เป็นต้น (Rattanachak *et al.*, 2022)

ไบโอฟิล์ม (biofilm) เกิดจาก planktonic เซลล์ หรือเซลล์ที่ล่องลอยของแบคทีเรียเกาะบนพื้นผิวและเริ่มสร้าง extracellular polymeric substance (EPS) ซึ่งประกอบด้วย glycolipids, glycoproteins, polysaccharides, proteins, และ DNA (Ricker *et al.*, 2018) แบคทีเรียที่อยู่ในไบโอฟิล์มสามารถเพิ่มจำนวนและแพร่กระจายออกจากไบโอฟิล์มเพื่อสร้างไบโอฟิล์มใหม่ได้ ถ้าหากแบคทีเรียดื้อยาจากการสร้างไบโอฟิล์ม การกำจัดแบคทีเรียอาจจะต้องใช้ยาปฏิชีวนะสูง 100 ถึง 1000 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกำจัดแบคทีเรียที่อยู่นอกไบโอฟิล์ม (Shors, 2013) สาเหตุสำคัญที่ทำให้แบคทีเรีย *P. aeruginosa* สามารถดื้อยาปฏิชีวนะได้ เนื่องจากการสร้างไบโอฟิล์ม ทำให้ยาปฏิชีวนะไม่สามารถแทรกผ่านไบโอฟิล์มเข้าไปทำลายแบคทีเรีย ได้ ดังนั้น การทำลายชั้นไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย หรือการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มในแบคทีเรีย จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยให้การรักษาโรคติดเชื้อมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ช่วยลดการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย และเป็นทางเลือกใหม่ในการกำจัดแบคทีเรียก่อโรคอย่างมีประสิทธิภาพ (Phee *et al.*, 2013; Yuan *et al.* 2019; Rattanachak *et al.*, 2022)

เฟจในธรรมชาติหาได้ง่ายดังนั้นการค้นหาเฟจที่สามารถทำลายแบคทีเรียดื้อยาจึงใช้เวลาน้อยกว่าการค้นหา ยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ เฟจเป็นทางเลือกหนึ่งในการกำจัดแบคทีเรียอย่างจำเพาะเจาะจง (Lin *et al.*, 2017) โดยเฉพาะในแบคทีเรียแกรมลบ และในกลุ่มแบคทีเรียที่สร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งเอื้อให้เกิดการดื้อยาและรักษาให้หายด้วยยาปฏิชีวนะยาก ข้อดีของการใช้



เฟจบำบัด (phage therapy) คือเฟจสามารถเข้าทำลายแบคทีเรียก่อโรคอย่างจำเพาะเจาะจงโดยไม่ทำลายแบคทีเรียอื่นที่ไม่ก่อโรค (Casto *et al.*, 2016) และเฟจมีความจำเพาะต่อแบคทีเรียมากกว่ายาปฏิชีวนะซึ่งมักจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแบบวงกว้าง ดังนั้น เฟจจึงสามารถกำจัดหรือทำลายแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคให้หมดไปแบบเจาะจง

งานวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกไลติกเฟจของ *P. aeruginosa* TISTR1287 และเพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* TISTR1287 โดยการคัดแยกไลติกเฟจจากแหล่งธรรมชาติในพื้นที่มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง งานวิจัยนี้สามารถทำให้เกิดทางเลือกใหม่ในการกำจัดแบคทีเรียและไบโอฟิล์ม

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดแยกไลติกเฟจด้วยวิธีการเพิ่มจำนวนเฟจ (Phage enrichment protocol)

เก็บตัวอย่างดินและน้ำ จากตำแหน่งพิกัดต่างๆ ในพื้นที่มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย จำนวน 3 และ 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ (Table 1) และนำมาคัดแยกไลติกเฟจที่สามารถบุกรุก *P. aeruginosa* TISTR1287 ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี phage enrichment protocol ซึ่งดัดแปลงจาก Padpai *et al.* (2017) ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ การเตรียมตัวอย่างดิน การคัดแยกไลติกเฟจด้วยวิธีการเพิ่มจำนวนในแบคทีเรียโฮสต์ และการทดสอบความสามารถในการบุกรุกแบคทีเรียโฮสต์ ดังนี้

การเตรียมตัวอย่างดิน นำดิน 50 กรัม มาผสมน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นแยกส่วนใสออกจากตะกอนดิน ที่ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

การคัดแยกไลติกเฟจด้วยวิธีการเพิ่มจำนวนในแบคทีเรียโฮสต์ กรองส่วนใสของดินและน้ำด้วยแผ่นเยื่อกรอง (filter membrane) ที่มีขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมกับอาหารเหลว 10X Luria-Bertani (LB) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำที่เรียกว่าขำคินของ *P. aeruginosa* TISTR1287 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำส่วนผสมไปเลี้ยงแบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยง ที่ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนใสออกจากเซลล์แบคทีเรีย และกรองส่วนใสผ่านแผ่นเยื่อกรองที่มีขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บรักษาส่วนใส หรือ สารละลายไลติกเฟจ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Padpai *et al.*, 2017) ก่อนนำไปทดสอบความสามารถในการบุกรุก *P. aeruginosa* TISTR1287 ด้วยวิธี spot test

การทดสอบความสามารถในการบุกรุกแบคทีเรียโฮสต์ ด้วยวิธี spot test (Dong *et al.*, 2018) โดยทดสอบกับแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR1287, *P. aeruginosa* TISTR781, *P. aeruginosa* DMST37186, และ *P. aeruginosa* TISTR1101 โดยแต่ละไอโซเลตทำการทดสอบ 3 ครั้ง เตรียมแบคทีเรียขำคินปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในอาหาร Luria-Bertani soft agar (LB + วุ้น 0.8%) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเทส่วนผสมลงบนผิวของอาหารแข็ง ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว หยดสารละลายไลติกเฟจปริมาตร 1 ไมโครลิตร บนผิวอาหารที่ผสมกับแบคทีเรีย นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง สังเกตวงใส (plaque) ที่เกิดขึ้นจากการบุกรุกของไลติกเฟจบนพื้นการเจริญของแบคทีเรีย



และทดสอบความสามารถของไลติกเฟจ PAMFUP1, PAMFUP2, PAMFUP3 และ PAMFUP4 ในการบุกรุก *P. aeruginosa* สายพันธุ์ TISTR1287, TISTR 781, TISTR1101 และ DMST37186

2. การแยกไลติกเฟจบริสุทธิ์และเพิ่มปริมาณไลติกเฟจ

การแยกไลติกเฟจให้บริสุทธิ์โดยเจือจางสารละลายไลติกเฟจด้วยสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) แบบลำดับส่วน 10 เท่า (10 fold serial dilution) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับแยกวงใสเดี่ยว ซึ่งเกิดจากการเข้าทำลายแบคทีเรียของเฟจ 1 อนุภาค (plaque forming unit, PFU) ด้วยวิธี double layer agar assay นำสารละลายไลติกเฟจในแต่ละความเข้มข้น 10 ไมโครลิตร ผสมกับแบคทีเรียข้ามคืนของ *P. aeruginosa* TISTR1287 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในอาหาร Luria-Bertani soft agar (LB + วุ้น 0.8%) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเทส่วนผสมลงบนผิวของอาหารแข็ง ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดวงใสบนพื้นการเจริญของแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR1287 (Padpai *et al.*, 2017) และคัดแยกวงใสเดี่ยวเพื่อเพิ่มจำนวนเฟจให้ได้ไอโซเลตที่มีความบริสุทธิ์

เลือกวงใสเดี่ยวแบบสุ่มมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ร่วมกับ *P. aeruginosa* TISTR1287 ที่บ่มข้ามคืน ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง บั่นแยกส่วนใสที่ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และกรองด้วยแผ่นเยื่อกรองที่มีขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสมาเจือจางด้วยสารละลาย PBS แบบลำดับส่วน 10 เท่า เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำสารละลายไลติกเฟจในแต่ละความเข้มข้น 10 ไมโครลิตร ผสมกับแบคทีเรียข้ามคืนของ *P. aeruginosa* TISTR1287 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในอาหาร LB + วุ้น 0.8% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเทส่วนผสมลงบนผิวของอาหารแข็ง ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดวงใสบนพื้นการเจริญของแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR1287 ทำซ้ำขั้นตอนนี้จำนวน 3 รอบ (Padpai *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2021)

การตกตะกอนไลติกเฟจ โดยนำส่วนใสที่กรองได้มาเติม Polyethylene glycol 8000 (PEG8000) 20% ใน 2.5 M NaCl ปริมาตร 2.5 เท่าของส่วนใสที่กรองได้ ผสมให้เข้ากันและบ่มสารละลายในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกตะกอนของไลติกเฟจ และละลายตะกอนของไลติกเฟจด้วยสารละลาย 1X Phosphate buffer saline (PBS) และเก็บรักษาไลติกเฟจในกลีเซอรอล 25% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Sharma *et al.*, 2021) นำส่วนใสจากรอบที่ 3 มาตกตะกอนในขั้นถัดไป

นับจำนวนเฟจโดยวิธี double overlay agar plaque assay โดยเจือจางสารละลายไลติกเฟจด้วยสารละลาย PBS แบบลำดับส่วน 10 เท่า นำตัวอย่างเฟจที่ระดับความเจือจางต่างๆ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในอาหาร LB + วุ้น 0.8% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติม *P. aeruginosa* TISTR1287 ที่บ่มข้ามคืน ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer แล้วเทลงบนอาหารแข็ง รออาหารแข็งตัวแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนวงใสที่เกิดขึ้น และคำนวณจำนวนเฟจในหน่วย PFU นำเฟจปริมาณ 10^6 PFU ไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม



3. ศึกษารูปร่างของไลดิกเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope หรือ TEM)

นำสารละลายไลดิกเฟจที่เก็บรักษาในกลีเซอรอล 25% (ขั้นตอนที่ 2) มาย้อมสีไลดิกเฟจแบบ negative staining โดยย้อมด้วย uranyl acetate ความเข้มข้น 2% (w/v) หยดลงบน carbon coated grid และทำให้แห้งโดยเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้นเป็นเวลา 3-5 วัน นำไปศึกษาภายใต้กล้อง TEM HITACHI รุ่น HT7700 ; 80 kV และวัดขนาดของไลดิกเฟจด้วยโปรแกรม ImageJ v.1.46d

4. ความสามารถในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (Anti-biofilm Activity)

ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม ดังนี้ เตรียมแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR1287 ที่มีความเข้มข้นของแบคทีเรียจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำแบคทีเรียไปเลี้ยงในโพลิสไตรีนไมโครไทเทอร์เพลทหลุมละ 149 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเฟจ (ปริมาณ 10^6 PFU) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และกลุ่มควบคุม *P. aeruginosa* ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง 8 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ล้างเซลล์แบคทีเรียออกด้วย 0.9% NaCl และตรึงไบโอฟิล์มโดยการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ย้อมไบโอฟิล์มด้วย 0.1% crystal violet เป็นเวลา 10 นาที ล้างสีส่วนเกินด้วย 0.9% NaCl ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมน้ำละลาย 30% acetic acid เพื่อละลายสีที่ติดอยู่ในไบโอฟิล์มและนำสารละลายสีที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร (Guo *et al.*, 2019) ทำการทดสอบเฟจทั้ง 4 ไอโซเลต จำนวน 3 ซ้ำ (Three independent experiment)

5. การตรวจสอบลักษณะของไบโอฟิล์มภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope หรือ SEM)

จำลองการสร้างไบโอฟิล์มบนกระจกปิดสไลด์แบบวงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 14 มิลลิเมตร โดยเลี้ยงแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR1287 ร่วมกับไลดิกเฟจประมาณ 10^6 PFU เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างเซลล์แบคทีเรียออก และตรึงเซลล์ด้วยสารละลาย 4% Paraformaldehyde เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และนำกระจกปิดสไลด์แบบวงกลมมาแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ตามลำดับความเข้มข้น ดังนี้ ร้อยละ 50, 70, 80, 90 ความเข้มข้นละ 10 นาที และเมื่อกระจกปิดสไลด์แบบวงกลมแห้ง จึงนำไปตรวจสอบลักษณะของเซลล์และไบโอฟิล์มภายใต้กล้อง Field Emission Scanning Electron Microscope ESCAN รุ่น MIRA4 (Czech Republic)

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistic analysis)

เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม โดยคำนวณหาค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง จากการทดสอบ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเฟจ ทั้ง 4 ไอโซเลต โดยทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงในแต่ละช่วงเวลาด้วยสถิติ ANOVA, F-test (SPSS v.20) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างเฟจด้วยวิธี Tukey's test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($p=0.05$)

ผลการวิจัย

การคัดแยกไลติกไลติกเฟจที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* TISTR1287 จากตัวอย่างธรรมชาติ
 เมื่อนำตัวอย่างจากดินและน้ำที่เก็บจากในพื้นที่มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย มาคัดแยกไลติกเฟจโดยเทคนิคการเพิ่มจำนวนเฟจในแบคทีเรียโฮสต์ *P. aeruginosa* TISTR1287 และทดสอบประสิทธิภาพในการบุกรุกและทำลาย *P. aeruginosa* จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ TISTR1287, TISTR 781, TISTR1101 และ DMST37186 ด้วยวิธี spot test พบว่า เฟจทั้ง 4 ไอโซเลต มีความจำเพาะเจาะจงค่อนข้างสูงต่อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* โดยเฟจ PAMFUP1 สามารถบุกรุก *P. aeruginosa* TISTR1287 และ TISTR1101 ในขณะที่ PAMFUP2, PAMFUP3 และ PAMFUP4 สามารถบุกรุกได้เฉพาะ TISTR1287 (Table 1)

Table 1 Specificity of the phage was examined in four different *P. aeruginosa* strains: TISTR1287, TISTR781, TISTR1101, DMST37186

Phage isolate	Sampling coordinates	Source material	Specificity tests			
			TISTR1287	TISTR781	TISTR1101	DMST37186
PAMFUP1	20°3'24" N., 99°54'55" E.	water	+	-	+	-
PAMFUP2	20°2'49" N., 99°53'27" E.	soil	+	-	-	-
PAMFUP3	20°2'51" N., 99°53'38" E.	soil	+	-	-	-
PAMFUP4	20°2'30" N., 99°53'26" E.	soil	+	-	-	-

Notes : (+), positive clear zone; (-), no clear zone.

เมื่อนำสารละลายเฟจแต่ละตัวอย่างมาทำการเจือจางและตรวจสอบลักษณะวงใสของไลติกเฟจด้วยเทคนิค double layer agar assay เพื่อศึกษาลักษณะวงใสเดี่ยวๆ ของไลติกเฟจในสารละลายเฟจแต่ละตัวอย่าง พบว่า ไลติกเฟจแต่ละตัวอย่างมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสแตกต่างกัน โดยวงใสของไลติกเฟจ PAMFUP4 มีขนาดใหญ่ที่สุด รองลงมาคือ PAMFUP3, PAMFUP1, และ PAMFUP2 ตามลำดับ (Figure 1)

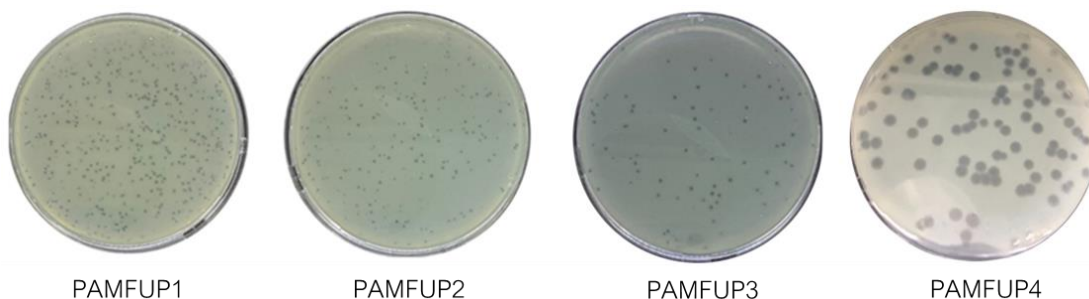


Figure 1 The appearance clear zone of the four lytic phage isolates.



การศึกษารูปร่างของไลดิกเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

รูปร่างของไลดิกเฟจ PAMFUP1, PAMFUP2, PAMFUP3 และ PAMFUP4 ประกอบด้วยส่วนหัวสมมาตรแบบลูกบาศก์ (icosahedral symmetric head) และส่วนหางที่สามารถยืดหดได้ (contractile tail) จัดอยู่ใน family *Myoviridae* (Figure 2) ไลดิกเฟจทั้งสี่มีความยาวเฉลี่ยจากส่วนหัวถึงส่วนหาง 119.3 ± 9.7 ถึง 148.9 ± 9.7 นาโนเมตร (n=10) (Table 2) ไลดิกเฟจ PAMFUP1 มีความยาวสูงสุด และ ไลดิกเฟจ PAMFUP4 มีความยาวน้อยที่สุด

Table 2 Comparisons of the morphology and clear zone diameters of the four lytic phage isolates.

Phage isolate	Total length (nm)	Head length (nm)	Head width (nm)	Tail length (nm)	Tail width (nm)	clear zone diameters (mm)
PAMFUP1	148.9 ± 9.0	77.0 ± 7.6	72.1 ± 5.6	64.3 ± 5.4	22.7 ± 2.7	0.80 ± 0.15
PAMFUP2	130.5 ± 7.3	61.2 ± 2.1	57.0 ± 3.7	58.4 ± 5.7	18.0 ± 2.0	0.77 ± 0.18
PAMFUP3	125.6 ± 5.2	58.9 ± 4.2	55.5 ± 4.6	62.3 ± 4.0	21.0 ± 2.1	0.98 ± 0.13
PAMFUP4	119.3 ± 9.7	62.6 ± 4.8	61.0 ± 5.7	53.0 ± 7.3	19.8 ± 2.8	3.90 ± 0.44

ความสามารถในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม

เมื่อนำไลดิกเฟจ PAMFUP1, PAMFUP2, PAMFUP3 และ PAMFUP4 มาศึกษาความสามารถในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR1287 โดยเลี้ยงแบคทีเรียร่วมกับไลดิกเฟจประมาณ 10^6 PFU เมื่อตรวจหาปริมาณไบโอฟิล์มที่เวลา 4, 8 และ 24 ชั่วโมง โดยการย้อมด้วย 0.1% crystal violet และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร พบว่าปริมาณไบโอฟิล์มของกลุ่มควบคุม *P. aeruginosa* TISTR1287 (PA) ที่ไม่มีไลดิกเฟจเข้าไปอาศัยมีค่าสูงสุดที่เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณไบโอฟิล์มจากกลุ่มทดลอง ซึ่งเลี้ยงแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR1287 ร่วมกับไลดิกเฟจทั้ง 4 ไอโซเลต อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.00$)

การเปรียบเทียบปริมาณไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* TISTR1287 ที่เกิดขึ้นที่เวลา 4 ชั่วโมง ปริมาณไบโอฟิล์มของกลุ่มควบคุม PA ไม่แตกต่างจากกลุ่มทดลองที่เลี้ยงแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR1287 ร่วมกับเฟจไอโซเลต PAMFUP1 และ PAMFUP4 (Figure 3) แต่ปริมาณไบโอฟิล์มของกลุ่มควบคุมมีมากกว่ากลุ่มทดลองที่เลี้ยงแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR1287 ร่วมกับเฟจไอโซเลต PAMFUP2 และ PAMFUP3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.00$) (Figure 3)

การเปรียบเทียบปริมาณไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้นที่เวลา 8 ชั่วโมง ปริมาณไบโอฟิล์มของกลุ่มควบคุม (PA) มีค่าสูงกว่าปริมาณไบโอฟิล์มของกลุ่มที่เลี้ยงแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR1287 ร่วมกับไลดิกเฟจทั้ง 4 ไอโซเลต อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.00$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเฟจทั้ง 4 ไอโซเลตสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ชัดเจนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 เป็นต้นไป

การเปรียบเทียบปริมาณไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้นที่เวลา 24 ชั่วโมง ให้ผลการทดสอบไปในทิศทางเดียวกันกับการยับยั้งไบโอฟิล์มที่ 8 ชั่วโมง โดยปริมาณไบโอฟิล์มของกลุ่มควบคุม มีค่าสูงกว่าปริมาณไบโอฟิล์มของกลุ่มทดลองที่เลี้ยงแบคทีเรีย

P. aeruginosa TISTR1287 ร่วมกับไลติกเฟจทั้ง 4 ไอโซเลตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.00$) และไลติกเฟจที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มดีที่สุด ได้แก่ ไลติกเฟจไอโซเลต PAMFUP2 และ PAMFUP3 ซึ่งเป็นไลติกเฟจที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินทั้ง 2 ไอโซเลต (Figure 3)

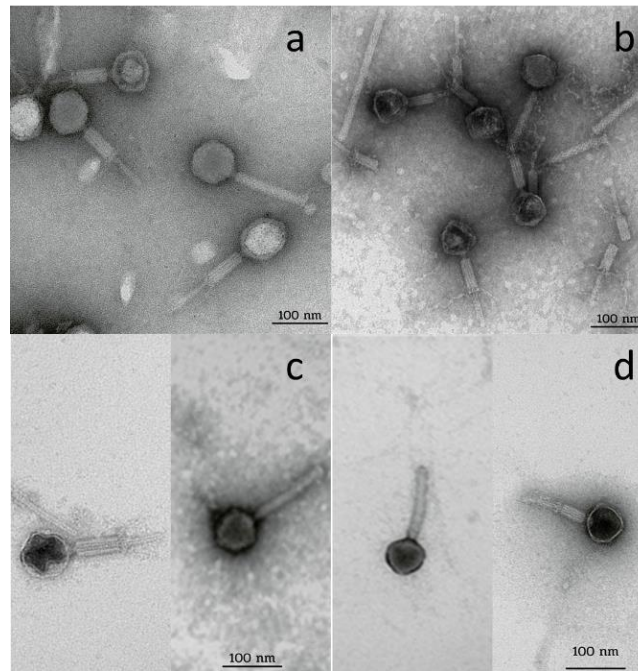


Figure 2 Transmitted Electron Microscope (TEM) showing of the four lytic phage isolates: PAMFUP1(a), PAMFUP2(b), PAMFUP3 (c), and PAMFUP4 (d). (scale bar = 100 nm).

ลักษณะไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* TISTR1287 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

จากการจำลองการสร้างไบโอฟิล์มในหลอดทดลองโดยเลี้ยงแบคทีเรียบนกระจกสไลด์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียร่วมกับไลติกเฟจ ทั้ง 4 ไอโซเลต เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไบโอฟิล์มของแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงร่วมกับไลติกเฟจ จะมีลักษณะไบโอฟิล์มที่ไม่สมบูรณ์และเซลล์แบคทีเรียที่ถูกทำลาย (Figure 4) จากผลการศึกษาลักษณะไบโอฟิล์มภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงให้เห็นว่าไลติกเฟจทั้ง 4 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* TISTR1287 ได้และการเลี้ยงไลติกเฟจร่วมกับแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม

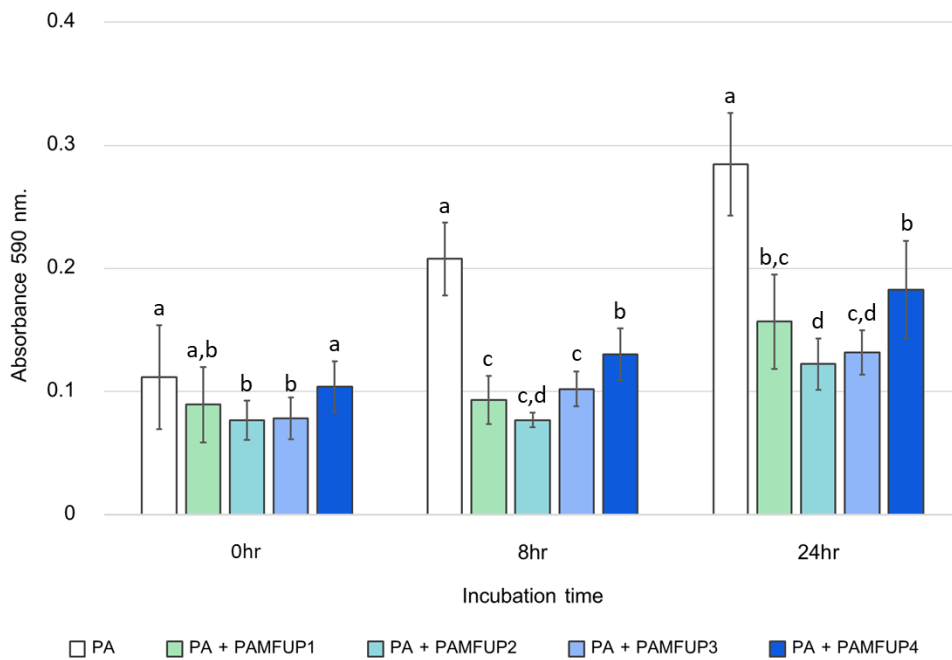


Figure 3 Crystal violet staining of the biofilm showing the biofilm inhibiting comparison between the four lytic phage (Tukey's test, $p=0.05$).

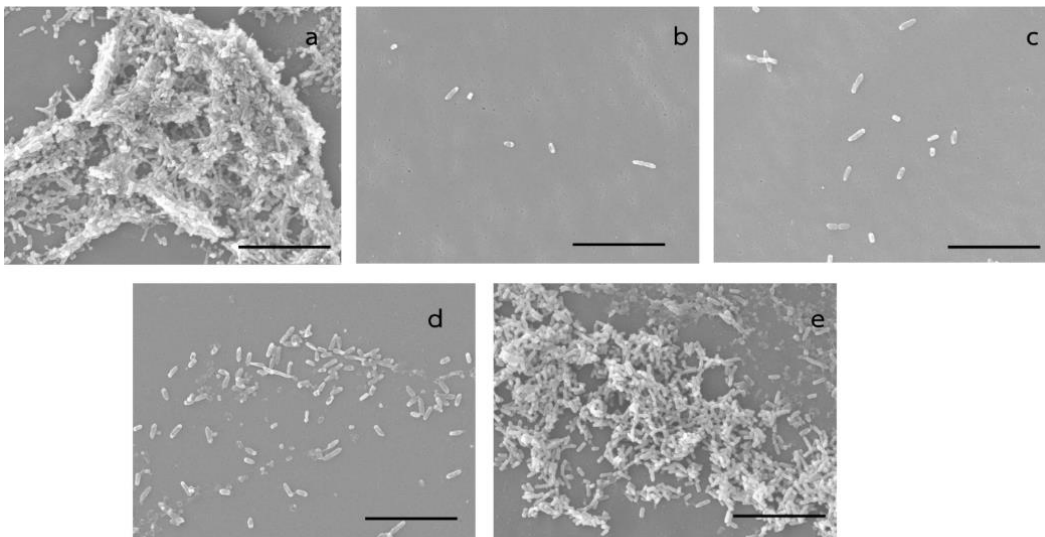


Figure 4 Scanning electron microscopy (SEM) of *P. aeruginosa* TISTR1287 biofilm surfaces; Control or *P. aeruginosa* TISTR1287 (a), *P. aeruginosa* TISTR1287 + PAMFUP1 (b), *P. aeruginosa* TISTR1287 + PAMFUP2 (c), *P. aeruginosa* TISTR1287 + PAMFUP3 (d), and *P. aeruginosa* TISTR1287 + PAMFUP4 (e). (scale bar = 10 nm)



วิจารณ์ผลการวิจัย

การคัดแยกไลติคเฟจที่สามารถบุกรุก *P. aeruginosa* TISTR1287 จากตัวอย่างดินและน้ำในพื้นที่มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย พบไลติคเฟจ จำนวน 4 ไอโซเลต ที่สามารถเข้าทำลายแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR1287 และทำให้เกิดวงใสที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางแตกต่างกัน ไลติคเฟจที่ทำให้เกิดวงใสเล็กกว่า 1 มิลลิเมตร ได้แก่ ไลติคเฟจ PAMFUP1 (0.80 ± 0.15 มิลลิเมตร), PAMFUP2 (0.77 ± 0.18 มิลลิเมตร) และ PAMFUP3 (0.98 ± 0.13 มิลลิเมตร) และไลติคเฟจ PAMFUP4 ทำให้เกิดวงใสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.90 ± 0.44 มิลลิเมตร ขนาดของวงใสของไลติคเฟจ PAMFUP1, PAMFUP2 และ PAMFUP3 เล็กกว่าวงใสของไลติคเฟจ MA-1 ที่สามารถทำลาย *P. aeruginosa*-2949 และไลติคเฟจ DRL-P1 ที่สามารถทำลาย multi drug resistant (MDR) *P. aeruginosa* ไลติคเฟจทั้งสองสามารถทำให้เกิดวงใสขนาด 1.5 ถึง 3.0 มิลลิเมตร (Adnan *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2021) ตามลำดับ ส่วนไลติคเฟจ PAMFUP4 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสค่อนข้างใหญ่และมองเห็นได้ชัดเจน

การศึกษารูปร่างของไลติคเฟจด้วยกล้อง TEM พบว่าไลติคเฟจ PAMFUP1, PAMFUP2, PAMFUP3 และ PAMFUP4 มีรูปร่างคล้ายกัน โดยไลติคเฟจทั้ง 4 ไอโซเลต ส่วนหัวมีลักษณะสมมาตรแบบลูกบาศก์และส่วนหางยึดและหดได้ ไลติคเฟจทั้ง 4 ไอโซเลต มีรูปร่างสอดคล้องคล่องกับรายงานการแยกไลติคเฟจจากธรรมชาติที่สามารถทำลาย *P. aeruginosa* เช่น การคัดแยกไลติคเฟจ MA-1 จากน้ำตัวอย่าง (Adnan *et al.*, 2020) ไลติคเฟจ DRL-P1 ที่แยกจากน้ำเสีย (Sharma *et al.*, 2021) ไลติคเฟจ PA5oct และ KT28 แยกจากตัวอย่างน้ำจากโรงผลิตน้ำใช้ของเทศบาล (Olszak *et al.*, 2015) และไลติคเฟจ vB_PaeM_LS1 แยกจากน้ำเสียของโรงพยาบาล (Yuan *et al.*, 2019) รูปร่างของไลติคเฟจ MA-1 ประกอบด้วยส่วนหัวกว้างประมาณ 63 นาโนเมตร ยาว 52 นาโนเมตร ส่วนหางที่สามารถยึดหดได้ยาว 130 นาโนเมตร กว้าง 12 นาโนเมตร จัดอยู่ใน family *Myoviridae* (Adnan *et al.*, 2020) เช่นเดียวกับกับไลติคเฟจ DRL-P1 ประกอบด้วยส่วนหัวเส้นผ่านศูนย์กลาง 69 นาโนเมตร ยาว 93 นาโนเมตร ส่วนหางยาว 95 นาโนเมตร กว้าง 17 นาโนเมตร (Sharma *et al.*, 2021) ไลติคเฟจ PA5oct และ KT28 จากตัวอย่างน้ำ รูปร่างไลติคเฟจทั้งสองจัดอยู่ใน family *Myoviridae* ไลติคเฟจ PA5oct มีส่วนหัวสมมาตรแบบลูกบาศก์เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 131 นาโนเมตร และส่วนหางเมื่อหดตัวยาว 136 นาโนเมตร ไลติคเฟจ KT28 มีเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนหัวประมาณ 70 นาโนเมตร (Olszak *et al.*, 2015) ไลติคเฟจ vB_PaeM_LS1 แยกจากตัวอย่างน้ำเสียของโรงพยาบาล ประกอบด้วยส่วนหัวสมมาตรแบบลูกบาศก์เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 70 นาโนเมตร ส่วนหางเมื่อหดตัวยาว 120 นาโนเมตร จัดอยู่ใน family *Myoviridae* (Yuan *et al.*, 2019) จากรูปร่างของไลติคเฟจที่คัดแยกมาจากธรรมชาติ PAMFUP1, PAMFUP2, PAMFUP3 และ PAMFUP4 ในการศึกษานี้ที่ประกอบด้วยส่วนหัวสมมาตรแบบลูกบาศก์และส่วนหางยึดและหดได้ที่มี basal plate สามารถจัดไลติคเฟจทั้ง 4 ไอโซเลต อยู่ใน family *Myoviridae*

การทดสอบการเข้าบุกรุกแบคทีเรียแบบจำเพาะเจาะจงของไลติคเฟจสามารถทำได้ด้วยวิธี spot test จากการทดสอบไลติคเฟจ PAMFUP1, PAMFUP2, PAMFUP3 และ PAMFUP4 พบความจำเพาะในการเข้าทำลายต่อ *P. aeruginosa* TISTR1287 ซึ่งใช้เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้านในการคัดแยกไลติคเฟจจากธรรมชาติ ไลติคเฟจทั้ง 4 ไอโซเลตไม่เข้าทำลาย *P. aeruginosa* ไอโซเลตอื่นที่ทำการศึกษา ยกเว้นไอโซเลต PAMFUP1 สามารถทำลาย *P. aeruginosa* ได้ทั้งสายพันธุ์



TISTR1287 และ TISTR1101 ตัวอย่างเฟจที่มีความจำเพาะต่อ *P. aeruginosa* เช่น DRL-P1 (Sharma *et al.*, 2021), vB_PaeM_LS1 (Yuan *et al.*, 2019), philBB-PACL22 และ philBB-PACL211 (Pires *et al.*, 2011) แสดงให้เห็นว่าไลติกเฟจที่แยกได้จากงานวิจัยนี้มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ของ *P. aeruginosa* TISTR1287 อย่างไรก็ตามในปัจจุบันการนำเฟจไปใช้ในทางการแพทย์หรือใช้ในการรักษาอาการคือยาส่วนใหญ่นิยมใช้เฟจบุกรุกแบคทีเรียได้หลายสายพันธุ์ (Yuan *et al.*, 2019) ซึ่งสอดคล้องกับอาการติดเชื้อของผู้ป่วยที่มักเกิดจากแบคทีเรียมากกว่าหนึ่งสายพันธุ์ (Bessa *et al.*, 2013; Nobel *et al.*, 2022) ดังนั้น การคัดเลือกเฟจไอโซเลตที่มีความสามารถในการบุกรุกแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นจึงเป็นสิ่งจำเป็น (Liu *et al.*, 2020)

P. aeruginosa ในธรรมชาติส่วนใหญ่ดำรงชีวิตอยู่โดยสร้างไบโอฟิล์ม (Bjarnsholt *et al.*, 2013) การกำจัดแบคทีเรียที่อยู่ภายใต้ไบโอฟิล์มด้วยยาปฏิชีวนะต้องใช้ปริมาณยาสูงขึ้น และหนึ่งในสาเหตุของการติดเชื้อเรื้อรังที่เกิดจากแบคทีเรียก่อโรคที่สร้างไบโอฟิล์ม (Chegini *et al.* 2020) การกำจัดไบโอฟิล์มจึงมีบทบาทสำคัญในการกำจัดแบคทีเรีย ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มียาป้องกันหรือกำจัดไบโอฟิล์ม (Bjarnsholt *et al.*, 2013) ไลติกเฟจเป็นชีววัตถุที่สามารถควบคุมไบโอฟิล์มของแบคทีเรียได้ จากผลการทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* TISTR1287 พบว่า กลุ่มควบคุม (ไม่มีเฟจ) มีการสร้างไบโอฟิล์มอย่างต่อเนื่อง โดยไบโอฟิล์มสูงสุดเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Figure 3) ปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มทดลองทั้ง 4 กลุ่ม เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาที่ 8 พบว่า กลุ่มทดลอง PAMFUP2 สามารถยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์มได้สูงสุด ที่ 63% รองลงมาได้แก่ PAMFUP1 (55%), PAMFUP3 (51%) และ PAMFUP4 (37%) ตามลำดับ และปริมาณไบโอฟิล์มในช่วงเวลาที่ 24 พบว่า กลุ่มทดลอง PAMFUP2 และ PAMFUP3 สามารถยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์มได้ใกล้เคียงกันที่ 57% และ 54% และกลุ่มทดลอง PAMFUP1 ยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์มได้ที่ 45% และ PAMFUP4 ยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์มได้ที่ 36% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการทดลองเลี้ยง *P. aeruginosa* TISTR1287 ร่วมกับไลติกเฟจทั้ง 4 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* TISTR1287 ได้

สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกไลติกเฟจจากธรรมชาติและทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR1287 พบไลติกเฟจจำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ PAMFUP1, PAMFUP2, PAMFUP3 และ PAMFUP4 การศึกษารูปร่างภายใต้กล้อง TEM พบว่าไลติกเฟจทั้ง 4 ไอโซเลต ประกอบด้วยส่วนหัวสมมาตรแบบลูกบาศก์และส่วนหางที่ยึดติดได้ จัดอยู่ใน family *Myoviridae* และเมื่อเลี้ยงไลติกเฟจทั้ง 4 ไอโซเลต ร่วมกับแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถลดการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ไลติกเฟจจึงเป็นชีววัตถุที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมจำนวนแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR1287 และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ ไลติกเฟจ PAMFUP1, PAMFUP2, PAMFUP3 และ PAMFUP4 มีความจำเพาะเจาะจงต่อ *P. aeruginosa* TISTR1287 อย่างไรก็ตามเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มต่อแบคทีเรียกลุ่มอื่น จึงจำเป็นต้องทดสอบความสามารถในการบุกรุกแบคทีเรียกลุ่มอื่นในอนาคต



กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม (กองทุน ววน.) ประเภททุน Basic Research Fund ประจำปีงบประมาณ 2565 ขอขอบคุณกลุ่มวิจัยผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์และนวัตกรรม มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการอนุเทคโนโลยีชีวภาพ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เอกสารอ้างอิง

- Adnan, M., Ali Shah, M. R., Jamal, M., Jalil, F., Andleeb, S., Nawaz, M. A., Pervez, S., Hussain, T., Shah, I., Imran, M., & Kamil, A. (2020). Isolation and characterization of bacteriophage to control multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* planktonic cells and biofilm. *Biologicals*, (63), 89–96.
doi: 10.1016/j.biologicals.2019.10.003.
- Bessa, J. L., Fazii, P., Di Giulio, M., & Cellini L. (2013). Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection. *International wound journal*, 12(1), 47-52.
doi: 10.1111/iwj.12049.
- Bjarnsholt, T., Ciofu, O., Molin, S. Givskov, M., & Høiby, N. (2013). Applying insights from biofilm biology to drug development - can a new approach be developed?. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(10), 791–808.
doi: 10.1038/nrd4000.
- Casto, A., Hurwitz, A., Kou, K., Casto, A., Hurwitz, A., Kou, K., Mansour, G., Mayzel, A., Policke, R., Schmidt, A., Shartel, R., Smith, O., Snyder, A., & Woolf, A. (2016). Bacteriophages: The answer to antibiotic resistance? *James Madison Undergraduate Research Journal*, 3(1), 36-41.
- Chegini, Z., Khoshbayan, A., Moghadam, M. T., Farahani, I., Jazireian, P., & Shariati, A. (2020). Bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a review. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 19(45), 1-17. doi: 10.1186/s12941-020-00389-5.



- Cisek, A. A., Dąbrowska, I., Gregorczyk, K. P., & Wyżewski, Z. (2017). Phage therapy in bacterial infections treatment: one hundred years after the discovery of bacteriophages. *Current Microbiology*, 74(2), 277–283. doi: 10.1007/s00284-016-1166-x.
- Dong, Z., Xing, S., Liu, J., Tang, X., Ruan, L., Sun, M., Tong, Y., & Peng, D. (2018). Isolation and characterization of a novel phage Xoo-sp2 that infects *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of General Virology* 99(10), 1453–1462. doi: 10.1099/jgv.0.001133.
- Guo, Y., Chen, P., Lin, Z., & Wang, T. (2019). Characterization of two *Pseudomonas aeruginosa* viruses vB_PaeM_SCUT-S1 and vB_PaeM_SCUT-S2. *Viruses* 11(4), 1-19. doi: 10.3390/v11040318.
- Lin, D. M., Koskella, B., & Lin, H. C. (2017). Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 8(3), 162–173. doi: 10.4292/wjgpt.v8.i3.162.
- Liu, J., Gao, S., Dong, Y., Lu, C., & Liu, Y. (2020). Isolation and characterization of bacteriophages against virulent *Aeromonas hydrophila*. *BMC Microbiology*, 20(141), 1-13. doi: 10.1186/s12866-020-01811-w.
- Nobel, F. A., Islam, S., Babu, G., AKter, S., Jebin, R. A., Sarker, T. C., Islam, A., & Islam, M. J. (2022). Isolation of multidrug resistance bacteria from the patients with wound infection and their antibiotics susceptibility patterns: A cross-sectional study. *Annals of Medicine and Surgery*, 84 (104894), 1-6. doi: 10.1016/j.amsu.2022.104895.
- Olszak, T., Zarnowiec, P., Kaca, W., Danis-Włodarczyk, K., Augustyniak, D., Drevinek, P., de Soyza, A., McClean, S., & Drulis-Kawa, Z. (2015). *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of environmental bacteriophages against *Pseudomonas aeruginosa* strains from cystic fibrosis patients. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(14), 6021-33. doi: 10.1007/s00253-015-6492-6.



- Padpai, N., Pumkachorn, P., & Rattanachaikulsopon. (2017). Isolation and characterization of lytic phages against antibiotic-resistant *Escherichia coli*. *Journal of Science and Technology Ubon Ratchathani University*. Special issue: 62-71. (in Thai)
- Phee, A., Bondy-Denomy, J., Kishen, A., Basrani, B., Azarpazhooh, A., & Maxwell, K. (2013). Efficacy of bacteriophage treatment on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Endodontics*, 39(3), 364–369. doi: 10.1186/s12941-020-00389-5.
- Phumkhachorn, P. & Rattanachaikunsopon, P. (2019). Bacteriophages: biology and applications. *Journal of Science & technology, Ubon Ratchathani University*, 21(3), 1-13. (in Thai)
- Pires, D., Sillankorva, S. Faustino, A., & Azeredo, J. (2011). Use of newly isolated phages for control of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and ATCC 10145 biofilms. *Research in Microbiology*, 162, 798-806. doi: 10.1016/j.resmic.2011.06.010.
- Ricker, E. B., Aljaafari, H. A. S., Bader, T. M., Hundley, B. S., & Nuxoll, E. (2018). Thermal shock susceptibility and regrowth of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Journal of Hyperthermia*, 34(2), 168–176. doi: 10.1080/02656736.2017.1347964.
- Rattanachak, N., Weawsiangsang, S., Daowtak, K., Thongsri, Y., Ross, S., Ross, G., Nilsri, N., Baldock, R. A., Pongcharoen, S., Jongjitvimol, T., & Jongjitvimol, J. (2022). High-throughput transcriptomic profiling reveals the inhibitory effect of Hydroquinine on virulence vectors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics*, 11 (1436), 1-16. doi: 10.3390/antibiotics11101436.
- Sharma, S., Datta, S., Chatterjee, S., Dutta, M. Samanta, J. Vairale, M. G. Gupta, R., Veer, V., & Dwivedi, S. K. (2021). Isolation and characterization of a lytic bacteriophage against *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 11(1),1–22. doi: 10.1038/s41598-021-98457-z.
- Shors, T. (2013). *Understanding viruses*. (2nd Edition). Burlington, MA: Jones & Bartlett Learning.



Yuan, Y., Qu, K., Tan, D., Li, X., Wang, L., Cong, C., Xiu, Z., & Xu, Y. (2019). Isolation and characterization of a bacteriophage and its potential to disrupt multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbial Pathogenesis*, 128, 329–336. doi: 10.1016/j.micpath.2019.01.032.